



TITLE:

ラットにおける総膵肝管結紮および膵管内圧上昇 model における膵腺房細胞の変化および ONO3307 の保護効果について

AUTHOR(S):

平野, 鉄也; 真辺, 忠夫; 四元, 文明; 安東, 勝宏; 戸部, 隆吉

CITATION:

平野, 鉄也...[et al]. ラットにおける総膵肝管結紮および膵管内圧上昇 model における膵腺房細胞の変化および ONO3307 の保護効果について. 日本外科宝函 1991, 60(5): 342-353

ISSUE DATE:

1991-09-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/203807>

RIGHT:

ラットにおける総膵肝管結紮および膵管内圧上昇 model における膵腺房細胞の変化および ONO3307 の保護効果について

京都大学医学部外科学教室第1講座

平野 鉄也, 真辺 忠夫, 四元 文明, 安東 勝宏, 戸部 隆吉

〔原稿受付: 平成3年6月28日〕

Changes of Acinar Cells in the Pancreatobiliary Duct Ligation with Exocrine Pancreatic Stimulation Model in Rats; Protective Effects of a New Potent Protease Inhibitor, ONO3307

TETSUYA HIRANO, TADAO MANABE FUMIAKI YOTSUMOTO,
KATSUHIRO ANDO, and TAKAYOSHI TOBE

First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan

To evaluate the changes of pancreatic acinar cells in the pancreatic duct obstructed animals as well as the protective effects of a new potent protease inhibitor, ONO3307, we measured the serum amylase levels, pancreatic water content, histological changes, lysosomal fragility in in-vitro incubation, cathepsin B distribution in acinar cells, and cathepsin B and amylase output into pancreatic juice after short-term (3 hrs) pancreatic duct obstruction with caerulein ($0.2 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{hr}$) infusion in rats.

Serum amylase levels, pancreatic water content, and lysosomal fragility in duct obstructed with caerulein infused animals were significantly increased compared with the control groups, and remarkable shift of cathepsin B from lysosomal fraction to zymogen fraction was observed in this group. These changes tended to continue 24 hours after removal of duct obstruction. But with infusion of ONO3307, these changes observed in duct-obstructed with caerulein infusion groups were significantly, almost completely attenuated.

These results indicate the intimate relationship between the pathogenesis of acute pancreatitis and lysosomes and some known proteases which are inhibited by ONO 3307 and suggest the usefulness of such a kind of protease inhibitor in the treatment of acute pancreatitis.

和文要旨; 膵胆管結紮時での膵腺房細胞の変化と新しい protease inhibitor である ONO3307 の保護効果を評

価する目的にて, ラットにおいて3時間の総膵胆管 (PBD) 結紮と同時に $0.2 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{hr}$ の caerulein 投与を

Key words: Acute pancreatitis, Lysosome, Cathepsin B, ONO3307, Pancreatobiliary duct ligation.

索引語: 急性膵炎, ライソゾーム, カテプシンB, ONO3307, 総膵胆管結紮.

Present address: First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, 54 Shogoin-Kawaracho, Sakyo, Kyoto 606, Japan.

行ない、膵水分量、組織学的変化、in-vitro での incubation での lysosome の脆弱性、膵腺房細胞内での cathepsin B 活性の分布、および膵液中への cathepsin B と amylase 分泌量を経時的に検討した。3時間の PBD 結紮・caerulein 刺激にて、血清 amylase 値、膵水分量、lysosome 脆弱性は control 群に比べ有意に上昇し、膵腺房細胞内では、cathepsin B 活性が lysosome 分画より zymogen 分画への移動・再分布 (redistribution) が観察され、これらの変化は PBD 結紮解除後も24時間持続する傾向を示した。しかし、ONO3307 (5 mg/kg・hr) の投与により、これらのすべての変化は有意に抑制され、膵腺房細胞への保護効果を示した。

これらの結果は、膵炎の病因論における lysosome 酵素の重要性とともに、ONO3307 により阻害される何らかの protease の膵胆管結紮 model における重要な役割を示唆させるとともに胆石性急性膵炎等の治療における protease inhibitor の有用性をも示唆させた。

目 的

急性膵炎の病因論としての胆石症、特に総胆管結石の重要性は以前より指摘されており^{1,4,11)}、日常臨床上においても、総胆管結石症に伴う高アミラーゼ血症等、膵機能障害はよく経験されることである。このように胆石症と膵障害については密接な関連があり、特に総胆管結石症に類似した動物 model での膵腺房細胞の変化を観察することは重要な意義があると考えられる。今回、この総胆管結石症 model として、ラットにおいて総膵胆管結紮 model を作製し、同時に膵管内圧上昇状態をも併せて作製し、膵腺房細胞の変化を種々のパラメーターより検討した。

また、膵炎起因物質として、従来より膵管系での活性化膵酵素等が考えられているが、lysosomal enzyme である cathepsin B は trypsinogen を活性化し得るとも言われ^{3,5)}、事実、ラットにおける caerulein 誘起性膵炎においては、膵腺房内での lysosomal enzyme である cathepsin B と膵酵素の colocalization が報告され^{13,14)}、膵炎の発症における lysosome の重要性が示唆されている^{16,17)}。他方、最近、ラットにおいて膵外分泌刺激ホルモンである caerulein 投与により、膵液中へ cathepsin B が分泌されることも判明しており^{6,7)}、cathepsin B は膵炎の病態生理において、膵腺房内および膵管腔系にて、何らかの役割を果たしているものと思われ、膵液中でのこの酵素の動態を観察すること

も意義があることと思われた。さらに、最近、新しい合成 protease inhibitor である ONO3307 が合成され、trypsin, phospholipase 等に対し強力な抑制効果があることも判明しており⁹⁾、このラットにおける総膵胆管結紮 model にて、ONO3307 の膵腺房細胞に対する保護効果も観察したのでその結果を併せて報告する。

材 料 と 方 法

I. 手術操作；この実験には78匹の雄性 Wistar 系ラット (体重；350~380 g) (静岡実験動物) を使用した。動物はすべて、明暗サイクル (明：5:00-17:00)、および温湿度 (20±3°C) の調節された動物実験施設にて飼育し、水分と食餌 (Purina Rodent Chow, Purina Mills, St. Louis, Mo, USA) を自由に摂取させ、実験まで最低1週間は動物実験施設にて飼育を行なった。また、実験前には16時間の絶食期間をもうけ、実験は午前9:00-10:00の間にいった。これらのラットを以下の4 group に分けた。

①総膵胆管 (PBD) 結紮+外分泌刺激 (CER) group；21匹のラットに pentobarbital の腹腔内投与 (25 mg/kg) 麻酔下、まず静脈ラインの作製の目的にて、右側外頸静脈への catheterization (V-3 catheter; Insul-Tab, Inc. Woburn, M.A., USA) を施行後、開腹し、PBD の十二指腸合流直上にて金属 clip にて PBD を結紮した。結紮前に血液を上記 catheter より0.5 ml 採取し、血清 amylase 値の測定をした。結紮直後より、静脈 catheter より膵外分泌刺激の目的にて cholecystokinin の analogue である caerulein (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) を 0.2 µg/kg・hr の濃度にて infusion pump (Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA) を用いて3時間持続静注した。この間、ラットには基礎輸液としてヘパリン加 (30 IU/ml) 生理食塩水を 0.58 ml/hr の速度にて静注した。3時間の PBD 結紮+外分泌刺激直後に全てのラットについて、金属 clip を除去し閉塞を解除し、そのうち7匹については血清 amylase 値の測定用に血液 0.5 ml を採取後、その場にて PE10 にて胆汁外瘻を作製後、PBD の十二指腸開口直上にて PBD に catheterization (PE50, Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) を施行し、20分の安定化後1時間にわたり膵液を水冷 pre-weighed eppendorf tube 中に採取し、膵液量の測定とともに、lysosomal enzyme である cathepsin B および膵酵素の amylase 活性を測定した。膵液の採取後、pentobarbital の大量投与にてラットを屠殺し、素早く膵を摘出し、ごく少量

の膵組織を phosphate-buffered 10% neutral formalin 中にて固定し、H-E 染色による組織学的検索用とし、さらに少量の膵組織をデシケーターにて (Isotemp®, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) 150°C, 48時間乾燥させ dry weight を測定し、乾燥前の wet weight と比較することにより pancreatic water content を算出した。残りの大部分の膵組織について、約半量を 5 mM MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid), 1 mM MgSO₄ を含有する氷冷 sucrose (250 mM) buffer (pH 6.5) 6 ml 中にて Dounce の homogenizer (Wheaton, Millville, NJ, USA) を使用して homogenate とし、150×g (4°C, 10分) の低速遠沈にてまず、unbroken cell や debris を除去後、その上清について、Tartakoff と Jamieson の原法¹³⁾に Saluja らの modification¹⁴⁾を加えた方法にて、細胞分画法を施行した。つまり、まず 1300×g (4°C, 15分) の遠沈にて、zymogen 分画を得、この上清についてさらに、12000×g (4°C, 12分) の遠沈を加え、lysosome 分画を得た。この最後の後上清は microsomal および soluble fraction と考えられ、これらすべての分画について lysosomal enzyme である cathepsin B 活性を測定し、全体量の%として表わし、cathepsin B の膵臓房内での分布の index とした。さらに残りの半量の膵臓房内での分布の index とした。さらに残りの半量の膵組織について、同様の細胞分画法を施行し、lysosome 分画を得、この分画を 25°C の室温下、MOPS buffer 中にて30分間隔にて120分まで incubation を行ない、各時期について再び 12000×g (4°C, 12分) の遠沈を施行し、その上清中の cathepsin B 活性を測定し (soluble activity)、全体量の%として (% of total) 表わし、lysosome の in-vivo incubation での脆弱性の index とした。このグループの他の14匹のラットについては3時間の PBD 結紮+CER 刺激後、一旦閉腹し、術後は、ヘパリン加生理食塩水を 0.21 ml/hr にて持続静注し、絶食とし水分のみを自由に摂取させ、術後12時間目に7匹、24時間目に7匹のラットに pentobarbital の麻酔下、再開腹し同様の protocol を施行した。

②総膵胆管 (PBD) 結紮+外分泌刺激 (CER)+ONO3307 group; 24匹のラットについて、PBD 結紮+CER 刺激群と同様の操作を加え、さらに ONO3307 を PBD 結紮中に 5 mg/kg・hr となるように 3時間持続静注し、結紮解除直後に8匹、12時間目に18匹、24時間目に8匹、同様の protocol を施行した。

③総膵胆管 (PBD) 結紮 group; 8匹のラットについ

て、同様に静脈ラインの作製、開腹下、PBD の結紮のみを施行し、結紮解除直後、12時間目、24時間目にそれぞれ6匹ずつ同様の protocol を施行した。

④単開腹 group; 15匹のラットについては、同様の静脈ライン作製後、単開腹のみを施行し、PBD の gentle manipulation 直後、12時間目、24時間目にそれぞれ5匹ずつ同様の protocol を施行した。

尚、すべての動物について、手術操作中は、heating pad (American Medical Systems, Cincinnati, OH, USA) および overhead lamp にて保温に努め、開腹創は金属 clip にて閉塞し、必要なら pentobarbital (10 mg/kg) の静脈内投与を施行した。

II. Assay; Amylase 活性は soluble starch (Fisher Scientific) を基質として Bernfeld の方法²⁾にて測定し、1単位 (U) の amylase 活性は 30°C にて基質より1分間に 1 mg の maltose を作製し得る活性値とした。また、lysosomal enzyme である cathepsin B 活性は CBZ-arginyl-arginine- β -naphthylamide (Bachem Bioscience, Inc., Philadelphia PA, USA) を基質とする McDonald と Ellis の方法¹⁰⁾にて測定した。1単位の (U) の cathepsin B 活性は基質より1分毎に 1 ng の β -naphthylamine (Sigma Chemical) を作製し得る活性とした。

膵の組織学的検索には、interstitial edema, inflammatory cell infiltration と acinar cell vacuolization の3点について、0 (変化なし) ~ 4+ (最大変化) の間で、binded observer により grading を行なった。

III. 統計学的処理; この実験での結果はすべて mean \pm SEM にて表わし、統計学的検索には ANOVA および Tukey の方法を用い p<0.05 以下をもって有意差ありと判定した。

結 果

①血清 amylase 値; 3時間の総膵胆管 (PBD) 結紮および caerulein 刺激により、血清 amylase 値は急速に上昇し (42 \pm 4 U/ml VS. 前値: 6 \pm 1 U/ml)、結紮解除後には12時間目には 18 \pm 3 U/ml、24時間目には 10 \pm 2 U/ml と徐々に結紮前の前値に復する傾向を示すが、単結紮群や結紮+ONO 群に比べその回復度は緩慢であった。PBD 単結紮群にしても血清 amylase 値は急速な上昇 (25 \pm 3 U/ml) を見せた (前値: 7 \pm 1 U/ml) が、結紮+caerulein 群に比べるとその上昇の程度は低く、24時間目にはほぼ正常値に回復するのが観察された。一方、PBD 結紮

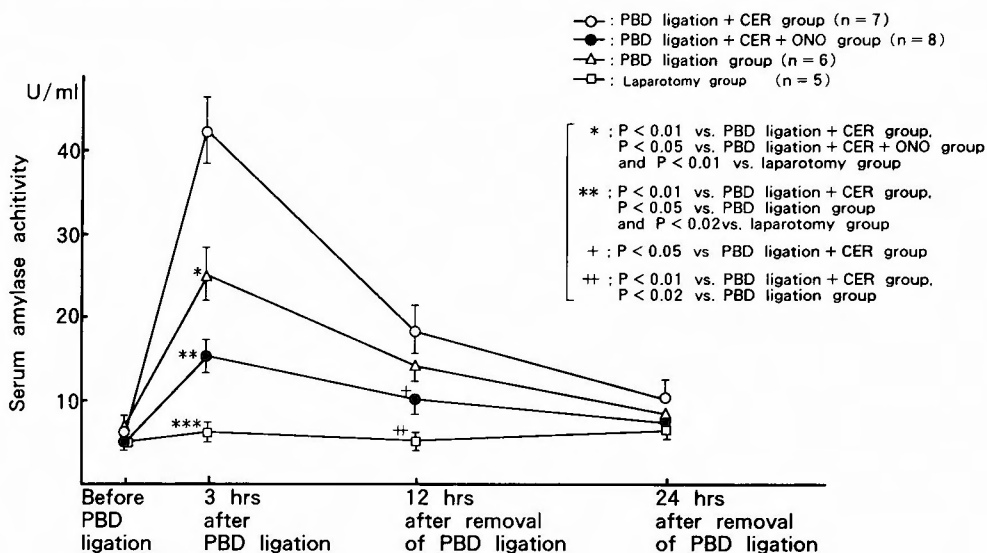


Fig. 1 Protective effects of ONO3307 on the changes in serum amylase levels induced by pancreatobiliary duct (PBD) ligation with caerulein infusion (CER) in rats. (—○—; PBD ligat. + CER group. (n=7), —●—; PBD ligat. + CER + ONO group (n=8), —△—; PBD ligat. group (n=6), —□—; laparotomy group (n=5), *: $p < 0.02$ vs. PBD ligat. + CER group, $p < 0.05$ vs. PBD ligat. + CER + ONO group, and $p < 0.01$ vs. laparotomy group, **: $p < 0.01$ vs. PBD ligat. + CER group, $p < 0.05$ vs. PBD ligat. group, and $p < 0.02$ vs. laparotomy group, +; $p < 0.05$ vs. PBD ligat. + CER group, ++; $p < 0.01$ vs. PBD ligat. + CER group, and $p < 0.02$ vs. PBD ligat. group)

Table 1 Protective effects of ONO3307 on the changes in the pancreatic water content induced by pancreatobiliary duct (PBD) ligation plus caerulein infusion in rats.

Group	n	Pancreatic water content (%)		
		3 hrs after PBD ligation or laparotomy	12 hrs after removal of PBD ligation	24 hrs after removal of PBD ligation
PBD ligation + CER	7	89 ± 3	82 ± 3	79 ± 3
PBD ligation + CER + ONO	8	78 ± 2*	76 ± 2	75 ± 2
PBD ligation	6	86 ± 2	79 ± 3	76 ± 2
laparotomy	5	75 ± 2*	76 ± 2	74 ± 2

*: $p < 0.05$ vs PBD ligation + CER group and PBD ligation group

PBD ligation + CER: Pancreatobiliary duct ligation with caerulein (0.2 μ g/kg·hr) infusion (3hrs) group

PBD ligation + CER + ONO: pancreatobiliary duct ligation with caerulein infusion plus ONO 3307 (5 mg/kg·hr) infusion group

+CER+ONO 群では血清 amylase 値の上昇がごく軽度 (15 ± 2 U/ml) であり (前値: 5 ± 1 U/ml), すでに12時間目にはほぼ正常に復する傾向を見せた (Fig. 1). 単開腹群では, 血清 amylase 値の大きな変

動は観察されなかった.

②脾水分量; PBD 結紮群において, caerulein 刺激群が3時間目に $89 \pm 3\%$ と最も上昇し, 単 PBD 結紮群も $86 \pm 2\%$ と次いで上昇を見せ, とともに ONO 群単

Table 2 Protective effects of ONO3307 on the histological changes induced by pancratico-biliary duct ligation with caerulein infusion in rats.

Group	n	Acinar cell vacuolization					
		3hrs after PBD ligation		12hrs after removal of PBD ligation		24 hrs after removal of PBD ligation	
PBD lig. +CER	7	3 +	(2 ⁻³) [2.6±0.2]	2 +	(1 ⁻³) [1.9±0.3]	1 +	(1 ⁻²) [1.3±0.2]
PBD lig. +CER +ONO	8	0	(0 ⁻²) b [0.4±0.3]	0	(0 ⁻¹) b [0.3±0.2]	0	(0 ⁻¹) [0.3±0.2]
PBD lig.	6	1 +	(0 ⁻²) c [1.2±0.3]	0	(0 ⁻¹) b [0.4±0.2]	0	(0 ⁻¹) [0.2±0.2]
laparotomy	5	0	(0) e [0]	0	(0) b [0]	0	(0) [0]

Group	n	Interstitial edema					
		3hrs after PBD ligation		12hrs after removal of PBD ligation		24 hrs after removal of PBD ligation	
PBD lig. +CER	7	4 +	(3 ⁻⁴) [3.7±0.2]	2 +	(2 ⁻³) [2.3±0.2]	1 +	(0 ⁻²) [0.9±0.3]
PBD lig. +CER +ONO	8	1 +	(1 ⁻²) [1.3±1.2]	1 +	(0 ⁻²) [0.6±0.3]	0	(0 ⁻³) [0.3±0.2]
PBD lig.	6	2 +	(1 ⁻³) [2.3±0.3]	1 +	(0 ⁻²) [1.0±0.3]	0	(0 ⁻³) [0.3±0.2]
laparotomy	5	0	(0) [0]	0	(0) [0]	0	(0) [0]

Group	n	Inflammatory cell infiltration					
		3hrs after PBD ligation		12hrs after removal of PBD ligation		24 hrs after removal of PBD ligation	
PBD lig. +CER	7	2 +	(2 ⁻³) [2.3±0.2]	2 +	(1 ⁻³) [1.7±0.3]	1 +	(1 ⁻²) [1.3±0.2]
PBD lig. +CER +ONO	8	0	(0 ⁻²) b [0.4±0.3]	0	(0 ⁻¹) c [0.3±0.2]	0	(0 ⁻¹) b [0.1±0.1]
PBD lig.	6	1 +	(0 ⁻²) c [1.2±0.3]	1 +	(0 ⁻²) [0.8±0.4]	0	(0 ⁻¹) c [0.3±0.2]
laparotomy	5	0	(0) e [0]	0	(0) b [0]	0	(0) c [0]

a: $p < 0.01$ vs PBD lig. +CER and $p < 0.05$ vs PBD lig, b: $p < 0.02$ vs PBDL lig. +CER
c: $p < 0.05$ vs PBD lig. +CER, d: $p < 0.01$ vs PBD lig. +CER, $p < 0.02$ vs PBD lig., PBD lig. +CER +FOY, e: $p < 0.01$ vs PBD lig. +CER, $p < 0.05$ vs PBD lig.

開腹群に比べ有意に高値をとったが、結紮解除後12時間目には、caerulein 刺激、単 PBD 結紮群が ONO 群、単開腹群に比べ尚、高値を示す傾向があるものの、24時間目には、ほぼ単開腹群と同様の値まで回復するのが見られた (Tab. 1).

③組織学的変化；組織学的には、血清 amylase 値、膵水分量の変化と合致するように、PBD 結紮 + caerulein 刺激群が interstitial edema, inflammatory cell infiltration, acinar cell vacuolization の3者とも

に最も強い変化を示し、単 PBD 結紮群においても軽度の変化が観察されたが、ONO 投与群においては、これら3者の変化を最小限にまで阻止するのが観察された。また、PBD 結紮 + caerulein 投与群においては結紮解除後24時間目においても軽度の組織学的変化が認められたが、PBD 単結紮群、ONO 投与群においてはこれらの変化はほぼ消失した (Tab. 2).

④膵腺房細胞内での cathepsin B の分布；3時間の

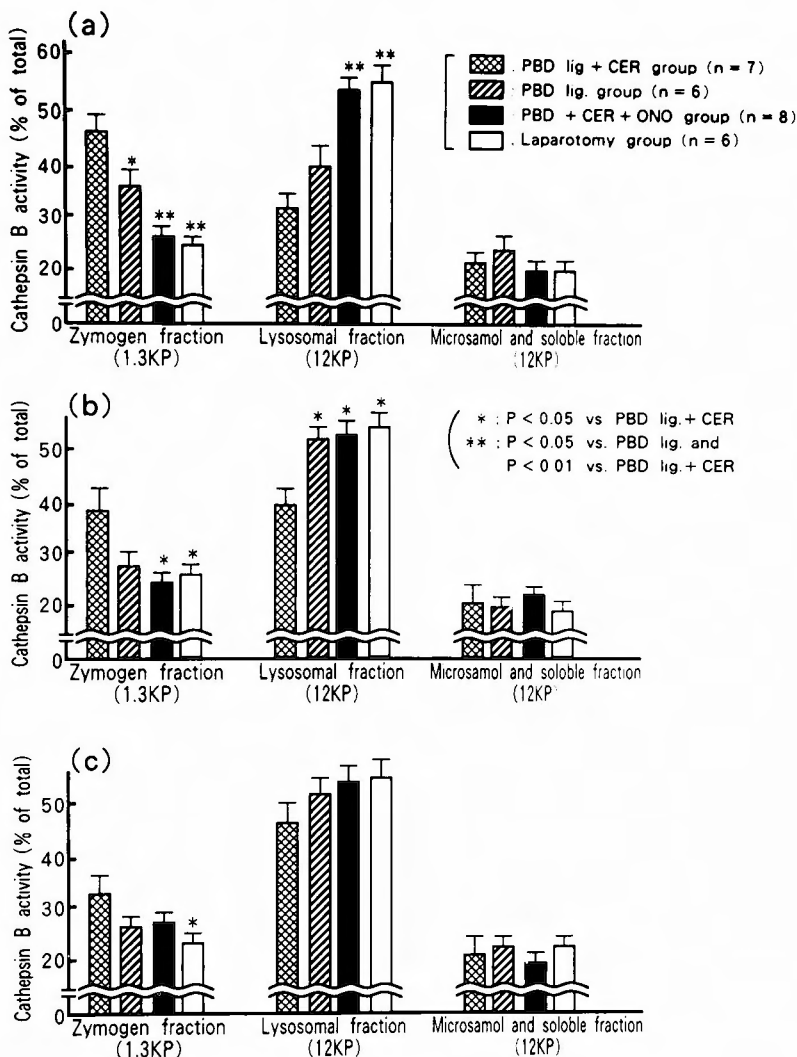


Fig. 2 Protective effects of ONO3307 on the changes in cathepsin B distribution induced by pancreaticobiliary duct (PBD) ligation with caerulein (CER) infusion in rats; (a) 3 hrs after PBD ligation, (b) 12 hrs after removal of PBD ligation, (c) 24 hrs after removal of PBD ligation. (▨; PBD ligat. + CER group (n=7); ▨; PBD ligat. group (n=6); ■; PBD ligat. + CER + ONO group (n=8); □; laparotomy group (n=5); *, p < 0.05 vs. PBD ligat. + CER group, **, p < 0.05 vs. PBD ligat. and p < 0.01 vs. PBD ligat. + CER group)

Table 3 Effects of ONO3307 on the changes in pancreatic juice volume induced by pancreatco-biliary duct ligation with caerulein infusion in rats.

Group	n	Pancreatic juice volume (ml kg·m)		
		3 hrs after PBD ligation	12 hrs after removal of PBD ligation	24 hrs after removal of PBD ligation
PBD ligation + CER	7	0.12±0.04 ⁺	0.36±0.04	0.26±0.03
PBD ligation + CER + ONO	8	0.39±0.06*	0.31±0.05	0.24±0.04
PBD ligation	6	0.32±0.04	0.28±0.04	0.23±0.02
Laparotomy	5	0.24±0.03*	0.25±0.02**	0.27±0.03

*: p<0.01 vs PBD ligation + CER, p<0.05 vs laparotomy group

** : p<0.05 vs PBD ligation + CER group

+ : p<0.05 vs laparotomy group, p<0.02 vs PBD ligation group, and p<0.01 vs PBD ligation + CER + ONO

PBD 結紮+caerulein 刺激により, lysosomal enzyme である cathepsin B は本来の lysosomal fraction (12 KP) (32±3%) より思い zymogen fraction (1.3 kp (46±3%) へ再分布しているのが観察された (Fig. 2a). 3 時間の PBD 単結紮のみにても軽度ではあるがこの傾向が観察された (1.3 kp; 36±2%, 12 kp; 40±4%). ONO 投与群においては, zymogen fraction が26±2%, lysosomal fraction (12 kp) が54±3% と, 単開腹群 (1.3 kp; 24±2%, 12 kp; 56±3%) とほぼ同様の値を示し, ONO 投与により, この cathepsin B の再分布はほぼ完全に抑制されることが判明した. この cathepsin B の再分布は, biochemical には, 膵酵素と lysosomal enzyme の colocalization を意味するものと考えられ, 膵腺房細胞内での膵酵素の活性化の危険性を内在しているものと考えられた. PBD 結紮解除後12時間目には, PBD 結紮+caerulein 刺激群, PBD 単結紮群も, まだ軽度の cathepsin B の再分布を示したものの (Fig. 2b), 24時間目には, ほぼ消失する傾向を示し, 血清 amylase 値, 膵水分量, 組織学的変化とほぼ合致する変動を示した.

⑤膵液中 cathepsin B, および amylase output ; 3 時間の PBD 結紮+caerulein 刺激により, 膵液の排出量は, 単開腹群を含め他の群に比べ有意に減少し, 膵

障害を示しているものと思われるが, PBD 単結紮群, PBD 結紮+caerulein+ONO 群では逆に, 単開腹群に比べ, 排出量が増加するのが観察された. PBD 結紮解除後には, 12時間目には, 逆に PBD 結紮+caerulein 群の方が単開腹群に比べ, 膵液排出量が有意に増加し, 膵組織障害からの回復を示し, 24時間後には, 4 群ともほぼ同様の値を示した (Tab. 3).

3 時間の PBD 結紮+caerulein 刺激群では, 膵液中の cathepsin B output が 4±1 U/kg·hr となり, 単開腹群 (9±1 U/kg·hr), PBD 単結紮群 (12±2 U/kg·hr) に比べ有意に減少し, 膵液排出量と同様の变化を示したが, 逆に, PBD 結紮+caerulein+ONO 群では 23±3 U/kg·hr となり, 他の3群と比べ有意に高値を示した (Fig. 3a).

この傾向は PBD 結紮解除後12時間目まで持続し, PBD 結紮+caerulein+ONO 群の cathepsin B output が 21±2 U/kg·hr となり, 他の3群に比べ有意に高値を示したが, PBD 結紮+caerulein 群も, PBD 結紮解除後12時間目には 13±2 U/kg·hr となり, 単開腹群 (10±2 U/kg·hr), PBD 単結紮群 (11±2 U/kg·hr) とほぼ同様の値を示した (Fig. 3b). PBD 結紮後24時間目には, 4 群ともほぼ同様の値を示した (Fig. 3c).

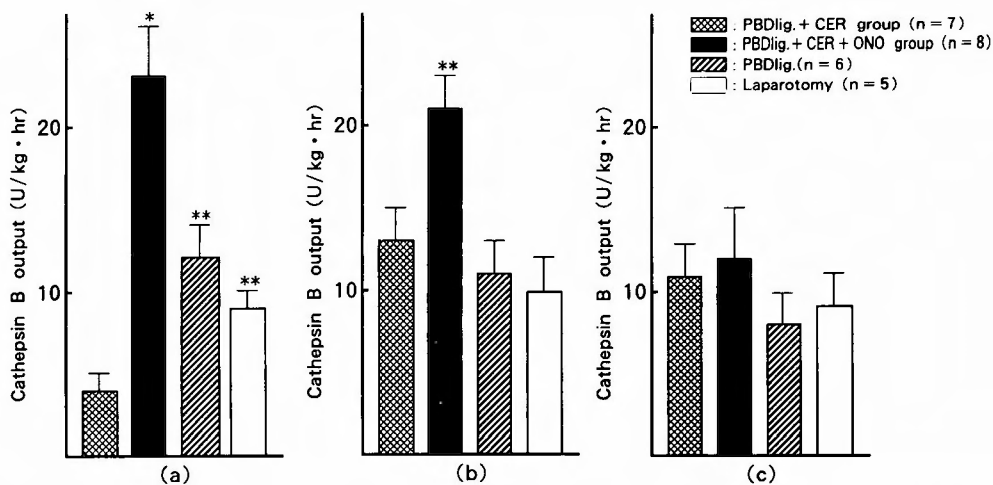


Fig. 3 Effects of ONO3307 on the changes in cathepsin B output into pancreatic juice induced by pancreato-biliary duct (PBD) ligation with caerulein (CER) infusion in rats. (a) 3 hrs after PBD ligation (b) 12 hrs after removal of PBD ligation, (c) 24 hrs after removal of PBD ligation. (The symbols and the number of each group are the same as in Fig. 2. *, $p < 0.01$ vs. PBD ligation + CER group and $p < 0.05$ vs. PBD ligation and laparotomy group, **, $p < 0.05$ vs. PBD ligation + CER group and laparotomy group)

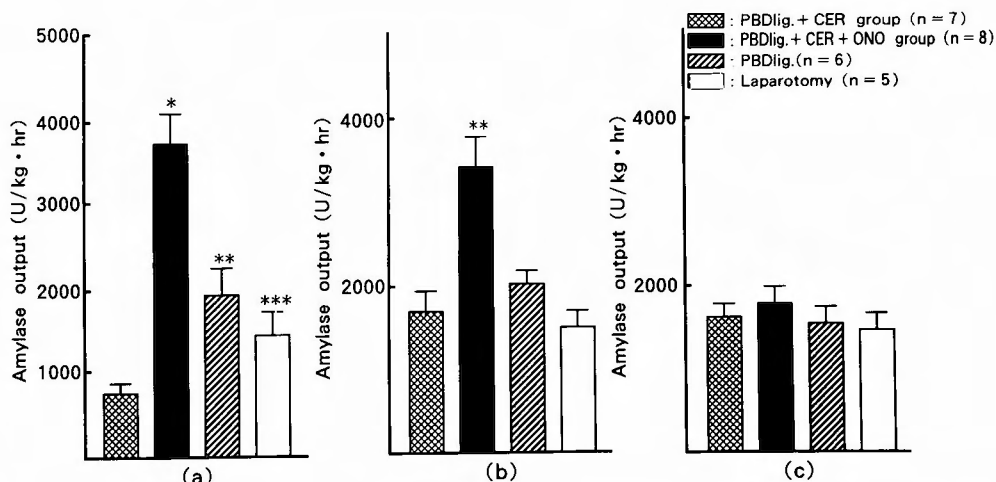


Fig. 4 Effects of ONO3307 on the changes in amylase output into pancreatic juice induced by pancreato-biliary duct (Pbd) ligation and caerulein (CER) infusion in rats. (a) 3 hrs after PBD ligation, (b) 12 hrs after removal of PBD ligation, (c) 24 hrs after removal of PBD ligation. (The symbols and the number of each group are the same as in Fig. 2. *, $p < 0.01$ vs. PBD ligation + CER group, **, $p < 0.02$ vs. PBD ligation + CER group, ***, $p < 0.05$ vs. PBD ligation + CER group.)

amylase output についても、3 時間の PBD 結紮 + caerulein 群では、 782 ± 131 U/kg · hr となり、単開腹群 (1481 ± 252 U/kg · hr)、PBD 単結紮群 (1926 ± 282 U/kg · hr) に比べ有意に減少し、膵外分泌機能障害を示唆したが、逆に PBD 結紮

+ caerulein + ONO 群にては、amylase output が 3749 ± 337 U/kg · hr を示し、単開腹群、PBD 群結紮群に比べ有意の増加を示した (Fig. 4a)。

PBD 結紮解除後12時間目には、PBD 結紮 + caerulein 群も amylase output は 1725 ± 229 U/kg

・hr と PBD 単結紮群 (2016±189 U/kg・hr), 単開
腹群 (1526±166 U/kg・hr) とほぼ同様の値を示し,
膵外分泌系の回復を示したが, PBD 結紮
+caerulein+ONO 群は, 3457±308 U/kg・hr とな

Table 4 Effects of ONO3307 on the changes in lysosomal fragility induced by pancreatobiliary duct obstruction with caerulein infusion in rat in in-vivo in cubation

(a)3 hrs after OBD ligation					
Group	n	Soluble cathepsin B activity (% of total)			
		Incubation time (min)			
		30	60	90	120
PBD lig. +CER	7	11±2	23±2	39±3	58±4
PBD lig. +CER +ONO	8	7±2	13±2 ^a	23±2 ^b	34±2 ^c
PBD lig.	6	10±2	20±2	34±3	47±3
laparotomy	5	6±1	11±2 ^b	18±2 ^d	31±3 ^c

(b) 12 hrs after removal of PBD ligation					
Group	n	Soluble cathepsin B activity (% of total)			
		Incubation time (min)			
		30	60	90	120
PBD lig. +CER	7	9±2	17±2	35±3	48±4
PBD lig. +CER +ONO	8	6±1	14±2	22±2 ^a	34±3 ^a
PBD lig.	6	6±1	12±2	19±2 ^a	32±2 ^a
laparotomy	5	8±2	14±2	21±2 ^a	35±3 ^a

(c) 24 hrs after removal of PBD ligation					
Group	n	Soluble cathepsin B activity (% of total)			
		Incubation time (min)			
		30	60	90	120
PBD lig. +CER	7	8±2	17±3	25±3	41±4
PBD lig. +CER +ONO	8	7±1	15±2	23±2	37±3
PBD lig.	6	6±1	14±2	21±2	35±2
laparotomy	5	7±2	13±2	19±2	33±4

a: p<0.05 vs PBD lig. +CER, b: p<0.05 vs PBDL lig. +CER and PBD lig.,
c: p<0.01 vs PBD lig. +CER and PBD lig., d: p<0.02 vs PBD lig. +CER and PBD lig.

り、他の3群に比べ有意に高値を示した (Fig. 4b). PBD 結紮解除後24時間目には、これら4群はほぼ同様の値を示し、有意差は見られなかった (Fig. 4c).

⑥In-vitro incubation での lysosomal fragility; 3時間の PBD 単結紮および PBD 結紮+caerulein 刺激にて in-vitro incubation lysosome の脆弱性は単開腹群に比べ特に60分以降の incubation time にて亢進しているのが観察されたが、PBD 結紮+caerulein+ONO 群はこれらの lysosomal fragility の亢進を有意に阻止するのが観察された (Tab. 4a). PBD 結紮解除後12時間にも、PBD 結紮+caerulein 群は90分以降の incubation time にて、まだ、lysosomal fragility の有意の亢進が他の3群に比べ観察されたが (Tab. 4b), PBD 結紮解除後24時間目にはもはや、4群の間に lysosomal fragility の差は観察されなかった (Tab. 4c).

考 察

胆石性肺炎、特に総胆管結石性肺炎の実験 model として、今回、ラットにおける単期間総膵単管結紮+膵外分泌刺激 (caerulein 投与) model にて種々の parameter から膵腺房細胞の変化を検討した結果、PBD 単結紮のみにも、血清 amylase 値、膵水分量の上昇、また組織学的には軽度の膵間質性浮腫、炎症性細胞浸潤、膵腺房細胞空泡化等の変化が認められたが、特に caerulein 刺激群にては、これら全ての変化が高度に観察され、膵管腔系の drainage 障害と膵外分泌系刺激による膵管内圧上昇が加わった場合、膵腺房細胞の障害は高度になり、膵炎の重症化へ進展する可能性が示唆された。

また、膵消化酵素と cathepsin B の様な lysosomal enzyme は両者とも rough endoplasmic reticulum にて合成され、Golgi 装置を経て、一方は zymogen granule へと他は lysosome へと^{8,15)}分離されて輸送され、これら2者の合成以後の膵腺房細胞内での同一の分画での共存は理論上考えられないが、以前より、膵炎の発症機序のひとつとして、lysosomal enzyme である cathepsin B と膵消化酵素の膵腺房細胞内での colocalization が想定されているか^{13,14)}、今回の PBD 結紮+caerulein 刺激群では、細胞分画法において cathepsin B が本来の lysosomal fraction (12 kp) より、さらに重い zymogen fraction (1.3 kp) へ移動再分布 redistribution しているのが観察され、新ためて、膵管結紮膵炎発症機序での lysosomal enzyme の重要性が示唆され

た。さらに、今回の様に3時間という短期間の総膵胆管結紮のみでは、結紮解除後には、徐々に膵外分泌系は膵損傷より回復し、解除後24時間目にはほぼ回復は完成すると考えられた。しかし、PBD 結紮+caerulein 群にては、結紮解除後24時間目にも、組織学的は軽度の膵損傷の所見を認め、膵損傷後の回復の遅延が見られた。膵胆管結紮時に細胞内小器官である lysosome の in-vitro incubation での脆弱性についての報告は少なく、今回、PBD 結紮のみにも lysosome の脆弱性が亢進することが判明し、さらに、PBD 結紮に caerulein 刺激が加えられた場合、より高度の lysosomal fragility の亢進が観察された。このことは、膵腺房内では、多量の lysosomal enzyme が zymogen granule へ混入するとともに、lysosomal 自体も脆弱性が亢進することを示唆させるものである。PBD 結紮+caerulein 投与群にては、結紮解除直後には、膵液の基礎分泌量も減少するが、解除後12時間目にはコントロール (単開腹群) とほぼ同様の値を示し、24時間後にはほぼ回復した。これに合致するように、膵液中への cathepsin B, amylase output も結紮解除後直後には減少し、24時間後にはほぼ回復する傾向を見せた。PBD 単結紮群では逆に結紮解除直後に単開腹群に比べ、膵液排出量 cathepsin B, amylase output とともに増加の傾向は見せたが、有意な程度ではなかった。PBD 結紮+caerulein 刺激群の如く、膵損傷が高度の群では、むしろ、膵液中の基礎 cathepsin B output と amylase output は減少していることが観察された。

新しい合成 protease inhibitor である ONO3307 は guanidino acid ester の一種で、trypsin, phospholipase A₂ や kallikrein 等の protease を強く抑制することが報告されており⁹⁾、430 dalton という分子量からも、膵血管床から膵腺房細胞内へ到達し得ることが十分期待され、膵炎での膵腺房細胞への保護効果が予想された。今回、PBD 結紮+caerulein 投与での model にて ONO3307 を同時に投与することにより、血清 amylase 値で膵水分量の上昇および膵の組織学的変化の阻止とともに、lysosome の脆弱性の亢進をも阻止することが判明した。

また、PBD 結紮解除後直後の膵液排出量、cathepsin B, および amylase output も、単開腹群や PBD 結紮群に比べむしろ増加しているのが判明した。これらの事実は、PBD 結紮+caerulein 刺激下では、ONO3307 にて阻害し得る何らかの protease が、その時の lysosomal enzyme の再分布と lysosomal fragility

の亢進に対し重要な役割を果たしているとも考えられ、ONO3307 は、その何らかの protease を阻害することにより、PBD 結紮+caerulein 刺激下では、zymogen fraction へ混入すべき運命の cathepsin B や膵腺房内でのうっ滞した amylase 等の膵酵素を、結紮解除後にすみやかに膵液中へ排出するという能力を膵腺房細胞に保持させるという役割を果たしていることも示唆された。

今回のこれらの結果は、PBD 結紮+caerulein 投与という膵炎 model において、ONO3307 の強力な膵外分系への保護作用を示唆するとともに、臨床上的膵炎の治療としての有用性を示唆させるものであり、総胆管結石症に伴う膵障害については、ONO3307 等の protease inhibitor の投与、および、膵外分泌系に対しては安静を保持し、刺激を避ける安静法が望ましいと考えられた。

更に、私達の以前の研究によれば、lysosomal enzyme が膵液中に基礎分泌として内在する以外に、caerulein 刺激によっても分泌刺激され得ることが判明しており^{6,7)}、今回の実験にても膵液中の cathepsin B 活性の存在が証明された。lysosomal enzyme である cathepsin B は trypsinogen を活性化し得るとも報告されており^{3,5)}、この膵管腔という膵腺房細胞外での lysosomal enzyme と膵酵素の共存にも膵炎の発生機序を考える上で考察する必要があることと思われた。

結 論

ラットにおいて、単期間 (3 時間) 総胆管 (PBD) 結紮+外分泌刺激 (CER 刺激) model にて膵腺房細胞の変化を経時的に検討した結果；

- ①総胆管 (PBD) 結紮のみにても血清 amylase 値、膵小分量の中程度の上昇と、組織学的変化 (間質性浮腫、炎症性細胞浸潤、膵腺房細胞空胞化) が観察されたが、PBD 結紮+CER 群にてはこれらの変化の高度に観察された。
- ②PBD 単結紮群では、結紮解除後24時間目には上記の parameter はほぼコントロール群の値に復したが、PBD 結紮+CER 群では結紮解除後24時間目にも組織学的な軽度の膵損傷所見を認めた。
- ③PBD 結紮群、PBD 結紮+CER 群ともに結紮後3時間目には膵腺房細胞内での cathepsin B の再分布とともに in-vitro incubation 系にて lysosome の脆弱性の亢進が認められ、PBD 結紮+CER 群に特に高度に観察されたが、解除後24時間目にはほぼコントロール値に復した。

- ④PBD 結紮+CER 群に ONO3307 を投与することにより、血清 amylase 値、膵水分量、膵組織像、膵腺細胞内での cathepsin B の再分布、lysosome の脆弱性の亢進すべての変化をほぼ完全に阻止し得た。
- ⑤PBD 結紮+CER+ONO 群においては短期間の PED 結紮解除直後には、膵液中への cathepsin B、および amylase output が PBD 結紮+CER 群や PBD 単結紮群に比べ、有意に増加しているのが観察された。
- ⑥以上より、ONO3307 は、PBD 結紮群や PBD 結紮+CER 群においての lysosomal enzyme の再分布や lysosomal fragility の亢進に関与する何らかの protease を阻害することにより、膵腺房細胞への保護効果を発揮しているとも考えられ、臨床上の胆石性膵炎への有用性を示唆するとともに、逆に、ONO3307 投与により結紮解除後には、かなりの量の cathepsin B が膵液中へ排出されることにより、ONO3307 等の protease inhibitor 使用時には、結紮解除後にも、膵管系に十分に注意を払う必要があるとも思われた。

付 記

この研究は文部省科学研究費 (一般 B-03454319) および厚生省難治性膵疾患研究費の援助を受けました。

文 献

- 1) Acosta JL, Ledesma CL: Gallstone migration as a cause of acute pancreatitis. *N. Engl. J. Med.* 290: 484-487, 1974.
- 2) Bernfeld P: Amylase α and β . *Methods Enzymol.* 1: 149-158, 1955.
- 3) Figarella C, Miszczuk-Jamska B, Varrett AJ: Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens. Activation of both human trypsinogen by cathepsin B and spontaneous acid activation of human trypsinogen. *I. Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369 (suppl.): 293-298, 1988.
- 4) Frei GJ, Grei VT, Thirlby RC, et al RN: Bioiary pancreatitis clinical presentation and surgical management. *Am. J. Surg.* 151: 170-175, 1986.
- 5) Greenbaum LM, Hirshkowitz A: Endogenous cathepsin activation of trypsinogen in extracts of dog pancreas. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107: 74-76, 1961.

- 6) Hirano T, Manabe T, Tobe T: Pancreatic lysosomal enzyme secretion is changed by hepatectomy in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* **25**: 1274-1280, 1990.
- 7) Hirano T, Saluja A, Ramarao P, et al: Apical secretion of lysosomal enzymes in rabbit pancreas occurs via a secretagogue regulated pathway and is increased after pancreatic duct obstruction. *J. Clin. Invest.* **87**: 865-869, 1991.
- 8) Kornfeld S: Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *J. Clin. Invest.* **77**: 1-6, 1986.
- 9) Matsuoka S, Futagami M, Ohno H, et al: Inhibitory effects of ONO3307 on various protease and tissue thromboplastin *in vitro* and an experimental thrombosis *in vivo*. *Jpn. J. Pharmacol.* **51**: 455-463, 1989.
- 10) McDonald JK, Ellis S: On the substrate specificity of cathepsin B₁ and B₂ including a new fluorogenic substrate for cathepsin B₁. *Life Sci.* **17**: 1269-1276, 1975.
- 11) Opie EL: The etiology of acute hemorrhagic pancreatitis. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **12**: 182-188, 1901.
- 12) Palade G: Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**: 347-358, 1975.
- 13) Saito I, Hashimoto S, Saluja A, et al: Intracellular transport of pancreatic zymogens during caerulein supramaximal stimulation. *Am. J. Physiol.* **253**: G517-526, 1987.
- 14) Saluja A, Hashimoto S, Saluja M, et al: Subcellular redistribution of lysosomal enzymes during caerulein-induced pancreatitis. *Am. J. Physiol.* **253**: G508-516, 1987.
- 15) Sly W, Fischer D: The phosphomannosyl recognition system for intracellular and intercellular transport of lysosomal enzymes. *J. Cell. Biochem.* **18**: 67-85, 1982.
- 16) Steer ML, Meldolesi J, Figarella C: Pancreatitis: the role of lysosomes. *Dig. Dis. Sci.* **29**: 934-938, 1984.
- 17) Steer ML, Meldolesi J: The cell biology of experimental pancreatitis. *N. Engl. J. Med.* **316**: 144-150, 1987.
- 18) Tartokoff A, Jamieson JE: Fractionation of guinea pig pancreas. *Methods Enzymol.* **31**: 41-59, 1974.